家蚕卵显微注射操作对蚕卵孵化及畸形蚕发生的影响

赵天福[1]，韩　冷[2]，王玉军[2]，朱　勇[1]，张高军[1]，中垣雅雄[2]
（1. 西南大学生物技术学院，重庆 400716；2. 信州大学纤维学部应用生物科学科，日本上田 386-8567）

摘要：早期胚胎显微注射是目前获得转基因家蚕 *Bombyx mori* 的主要途径。显微注射操作对蚕卵的损伤导致注射后的蚕卵孵化率降低，是家蚕转基因工作的主要障碍之一。本研究对不同卵龄的蚕卵进行了开孔或注射实验，并对产后5 h 的蚕卵上背侧、腹侧、前极、后极和中央等5 个不同的位置进行了开孔实验，调查了卵孵化率和体形异常蚕的产生情况。结果表明：较早卵龄期的注射或从蚕卵背侧的注射可以获得高的孵化率。腹侧注射产生大量的体形异常蚕而背侧注射的蚕完全正常。通过调整注射时期和注射位置避开上述影响可以减少死卵和畸形蚕，提高孵化率。本研究为改进家蚕转基因操作技术提供了有效的参考。
关键词：家蚕；卵；转基因；显微注射；畸形；孵化率
中图分类号：Q963　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2013)05-0499-06

Effect of different microinjection operation of eggs on egg hatchability and the occurrence of malformation in the silkworm, *Bombyx mori*

ZHAO Tian-Fu[1], HAN Leng[2], WANG Yu-Jun[2], ZHU Yong[1], ZHANG Gao-Jun[1], NAKAGAKI Masao[2]
(1. College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Department of Applied Biology, Faculty Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386-8567, Japan)

Abstract: The technology of microinjecting preblastodermic eggs is currently the main operation to obtain the transgenic silkworm (*Bombyx mori*). Microinjection will cause damage to silkworm eggs, and lead to the decrease in the hatchability of the injected eggs, which is one of the major problems of the transgenic technology of the silkworm. In this study, the eggs were microinjected at different embryonic age and on different positions of egg including dorsal side, ventral side, anterior pole, posterior pole and the center at 5 h after egg laying, to investigate the effect of these factors on egg hatchability and the occurrence of larval malformation in the silkworm. The results showed that microinjection operated at the earlier embryonic age or from the dorsal side increased the hatchability of those injected eggs. Microinjection from the dorsal side brought out normal larvae, while microinjection from the ventral side led to a lot of malformed larvae. It is so inferred that choosing the suitable injection time and correct position will eliminate the occurrence of malformation and increase egg hatchability to some extent. This study provides a useful reference for improving the transgenic operation of the silkworm.
Key words: *Bombyx mori*; egg; transgenesis; microinjection; malformation; egg hatchability

随着生物工程技术的成熟和普及，通过转基因手法进行家蚕 *Bombyx mori* 品种改良成为技术创新的重要方法。目前将外源基因导入蚕体的常见方法主要有精子介导(郭秀洋等，2001)、电子基因枪轰击(孟智启等，1992)和显微注射(Kanda *et al.*, 1991)等，其中家蚕早期胚胎显微注射法以其转基因成功率高、操作相对简便等优点成为目前利用最多的一种方法。研究者用该方法成功地获得了表达荧光蛋白、胶原蛋白、干扰素等的家蚕(Tamura *et al.*, 2000；Tomita *et al.*, 2003；Kurihara *et al.*, 2007)。

通常，对家蚕早期胚胎显微注射是用钨针在产下3 ~ 6 h 的蚕卵腹侧中部开孔，再将预先灌入了核酸溶液的强化毛细玻璃管通过上述开孔插入卵内，利用向玻璃管后侧施加适当的气压，将管内的核酸溶液推入卵中(Tamura *et al.*, 2000；Tomita *et

基金项目：中央高校基本科研业务费专项(XDJK2009B031)；西南大学博士基金项目(SWU110004)
作者简介：赵天福，男，1968 年11 月生，贵州织金人，博士，特聘副教授，主要从事家蚕遗传育种研究，E-mail：zhaotianfu@gmail.com
收稿日期 Received：2013-03-22；接受日期 Accepted：2013-05-14

al., 2003)。由于家蚕卵有厚而硬的卵壳包被，对蚕卵进行注射时开孔操作必不可少。选择从腹侧中央注射是因为此处是将来生殖细胞发生的位置，有利于获得可遗传的转基因个体。金属针和玻璃管的两次插入对蚕卵造成损伤，致使被注射蚕卵的成活率过低，这一现象一直是困绕转基因工作者的难题。不恰当的注射操作甚至导致蚕卵完全不孵化。与此同时，在从早期胚胎时期注射的蚕卵孵化的蚕中，屡见体形异常个体的发生。这些畸形蚕或不能正常蜕皮和变态，或形成畸形的蛹或蛾，严重者中途死亡不能完成生活周期。如何减少畸形蚕的产生、提高注射卵的孵化率？这在提高转基因工作的效率上显得十分重要。从事家蚕卵显微注射的研究者主要延用 Tamura 等(2000)的方法。注射卵的孵化率参差不齐，高的可达 65.7%（Tamura *et al*., 2000)，低的在 1% 以下(徐汉福等，2011)，百分之几到 30% 左右的居多(Tomita *et al*., 2003；Wen *et al*., 2010)。马三垣等(2009)报道注射时间和蚕品种等会影响孵化率。尚没有关于蚕卵上不同注射位置引起的畸形蚕的报道。本研究探讨了注射操作与死卵及畸形蚕产生的关系，分析其原因，为改进显微注射方法和促进家蚕转基因研究和应用提供操作方法的参考。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

家蚕卵：采用经改良用于转基因的蚕品种 NW 的蚕卵。该品种蚕为多化性，眼色白色。多化性蚕卵产下后勿需人工孵化处理即可直接用于蚕卵早期胚胎注射。白眼色有利于观察色素报告基因的表达情况。蚕孵化后在春季用桑叶饲养，其产下的蚕卵用于显微注射。

1.2 供试试剂

注射缓冲液：为了尽量减少可变因素的影响，本实验的注射操作使用的注射用缓冲液不含核酸，即：含有 5 mmol/L KCl 的 0.5 mmol/L 磷酸缓冲液（pH 7.0）(Tamura *et al*., 2000)。注射使用 Eppendorf FemtoJet 注射仪完成。

1.3 在蚕卵不同位置的开孔操作

让交配后的雌蛾将蚕卵产在上浆连纸上。蚕卵产下后于 25℃ 下保护到实验前 30 min，用清水从连纸上将卵连同浆糊洗下。为便于操作和统计，利用卵上附着的浆糊将蚕卵按统一的方向粘贴到载玻片上，待浆糊自然干燥、蚕卵粘贴牢固以后开始注射操作的实验。

参照 Takami(1969)的方法。将卵面划分为腹侧、背侧、前极和后极，将蚕卵卵窝位置的中心部分称为蚕卵中央(图 1)。分别在蚕卵的腹侧、背侧、前极、后极和中央位置用鸽针开孔，随后用无毒速干胶封口。开孔操作在蚕卵产下约 5 h 时进行，开孔深度以刚好刺破卵壳为准，鸽针尽量不深入蚕卵内部。

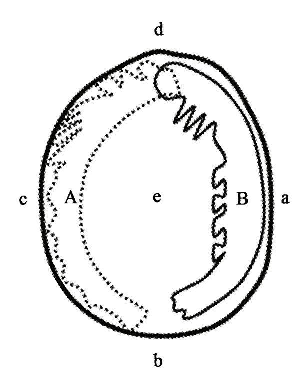


图 1 在蚕卵发育的胚胎反转期前后的胚胎位置及显微注射位置的示意图

Fig. 1 Schematic diagrams of the embryo position around the blastokinesis stage during the silkworm egg development and microinjection position

A：反转前 Before blastokinesis；B：反转后 After blastokinesis；a：背侧 Dorsal side；b：后极 Posterior pole；c：腹侧 Ventral side；d：前极 Anterior pole；e：中央 Center.

1.4 对不同卵龄蚕卵的开孔和注射

不同卵龄的开孔和注射实验只对蚕卵上的背侧和腹侧进行。开孔方法同 1.3 节。注射方法参考 Tamura 等(2000)的方法进行。注射时在蚕卵开孔后立即向所开孔中插入预装注射缓冲液的强化毛细玻璃管，通过空气压向卵内注入 15 ~ 20 nL 缓冲液。玻璃管插入深度约为蚕卵短径的一半，即尖端到达卵中央附近区域。注射后的蚕卵立即用无毒速干胶封口以防止内容物的流失。

从蚕卵产下时刻开始计算卵龄。取卵龄约3.5，4，5 和 6 h 的蚕卵用于实验。产卵时严格控制每批卵的产卵开始和结束时间，以使卵龄开差在 30 min 之内。由于蚕蛾产卵的速度不同，为了准确掌握处理时的实际卵龄，实验时记录各处理的蚕卵在开孔时的最大卵龄、最小卵龄，计算各组蚕卵处理时的平均卵龄。

1.5 注射后的蚕卵保护、孵化蚕的饲养和调查

注射后的蚕卵，置于 25℃、RH 80% 的密闭盒

中恒温保湿，约经 9 d 后胚子着色（称为转青卵，此时期称为转青期），次日开始陆续孵化。调查统计孵化卵、转青期死卵及未到达转青期的其他前期死卵的比例。统计总卵数、孵化卵数，计算孵化率。孵化的蚕继续按常规方法饲养，直到化蛹、羽化、交配和产卵。饲养过程中观察蚕的体型，对体形与正常蚕有明显不同的个体作为畸形个体予以记录。5 龄起蚕时按蚕体上畸形发生的位置和形状等细节将畸形蚕分类为胸足异位、腹足异位、体节扭曲等 3 类，跟踪畸形蚕的结茧和化蛾情况。

2　结果与分析

2.1　不同开孔位置的蚕卵孵化结果

在卵龄为 5 h 的蚕卵上 5 个不同位置进行开孔实验的蚕卵孵化率、转青死率和其他早期死卵率统计如表 1。对照为不开孔的蚕卵。

表 1　在家蚕卵产下约 5 h 时不同开孔位置的蚕卵孵化率

Table 1　The hatchability of *Bombyx mori* eggs on different puncture position at 5 h after egg laying

开孔位置 Puncture position	总卵数 Number of punctured eggs	孵化率（%） Egg hatch rate	转青死卵率（%） Proportion of dead eggs at body pigmentation stage	其他早期死卵率（%） Proportion of dead eggs at other stage
前极 Anterior pole	103	19.0	65.3	15.8
腹侧 Ventral side	56	37.0	33.3	29.6
后极 Posterior pole	107	63.5	22.1	14.4
背侧 Dorsal side	55	68.0	18.0	14.0
中央 Center	150	25.5	61.7	12.8
未开孔（对照）Unpunctured（control）	45	100.0	0.0	0.0

从表 1 可见，开孔蚕卵的孵化率因开孔的位置不同差异很大。其中，背侧开孔的孵化率最高，其他依次为后极、腹侧、中央，前极开孔处理的孵化率最低。对照区蚕卵全部孵化。转青前的各种死卵比例，除腹侧处理的稍高以外，其他处理基本类似（在 14.3% ±1.5%）。转青死卵率在各处理间的差异较大，背侧和后极处理的较低，约为 20%，前极与中央处理的高达到 60% 以上，腹侧处理介于两者之间。其中前极处理的转青死卵率最高，约占总卵数的 2/3。

另对蚕卵背侧和腹侧做开孔实验，调查统计孵化率如表 2。背侧开孔处理区的平均孵化率为 48.70%，高于腹侧开孔区的 14.25%。单因素方差分析结果，两处理的平均孵化率在 0.01 水平上有显著差异。

2.2　不同注射卵龄和注射位置的蚕卵孵化结果

对不同卵龄实验组的孵化率统计如表 3。卵龄为产卵到注射时刻所经过时间。各处理蚕卵中最大与最小卵龄的平均值为该处理的中间卵龄。各组卵龄开差不超过 30 min。对背侧和腹侧注射蚕卵孵化率的比较可以发现，无论在哪一个卵龄阶段，背侧注射孵化率都远远高于腹侧注射。这与上述单独开孔实验时的趋势相同。在相同注射位置处理中则随着卵龄的增加，注射卵的孵化率逐渐降低。

2.3　不同开孔或注射位置的畸形蚕发生情况

取卵龄约 5 h 的蚕卵分别对其背侧或腹侧进行仅开孔不注射操作或开孔加注射操作，统计了孵化情况和畸形蚕的产生数如表 4。其中畸形蚕比例是指畸形蚕占同区孵化蚕的比例。如表 4 所示，无论是开孔或是开孔加注射操作，背侧处理中都没有发现畸形个体。而腹侧处理共发现 17 头体型异常蚕。在腹侧处理产生的 17 头异常蚕中，仅开孔区共观察到 6 头畸形蚕，占孵化蚕的 3.9%，开孔加注射操作处理区 11 头，占同处理孵化蚕的 22.5%。与单独开孔操作相比，开孔加注射的操作处理区的畸形蚕比例更高。

上述各处理畸形蚕的特征和头数整理如图 2。本次观察到的 17 头畸形蚕，体形异常发生在胸足、腹足、胸节及前部腹节。按异常类型区分：单纯体节扭曲变形 5 头，单纯附肢（胸足或腹足）异位的共 7 头，其余 5 头在体节变形的同时伴随附肢（胸足或腹足）异位。本次没有观察到腹足和胸足同时异位或其他位置异常的个体。

表 2 在家蚕卵产下约 5 h 时的蚕卵背侧和腹侧开孔的蚕卵孵化率比较

Table 2 Comparison of the hatchability of *Bombyx mori* eggs between punctured from the dorsal side and the ventral side at 5 h after egg laying

开孔位置 Puncture position	开孔卵数 Number of punctured eggs	孵化卵数 Number of hatched eggs	孵化率(%) Egg hatch rate
腹侧 Ventral side	46	7	15.2
	47	11	23.4
	37	2	5.4
	36	3	8.3
	29	4	13.8
	31	6	19.4
平均 Mean value			14.25
均方差 Mean square deviation			6.709
背侧 Dorsal side	48	32	66.7
	48	19	39.6
	38	20	52.6
	39	22	56.4
	33	13	39.4
	32	12	37.5
平均 Mean value			48.70
均方差 Mean square deviation			11.775

表 3 不同注射卵龄和注射位置蚕卵的孵化率

Table 3 The hatchability of *Bombyx mori* eggs at different embryonic age of injection and on different injection position

平均卵龄 Mean embryonic age	背侧注射 Dorsal injection		腹侧注射 Ventral injection	
	总卵数 Number of injected eggs	孵化率(%) Egg hatch rate	总卵数 Number of injected eggs	孵化率(%) Egg hatch rate
3 h 40 min	38	81.6	32	40.6
4 h 10 min	18	77.8	25	32.0
5 h 10 min	30	53.3	30	16.7
6 h 00 min	22	31.8	22	9.1

卵龄为产卵到注射时刻所经过时间 Embryonic age is defined as the period between egg laying to microinjection.

表 4 在 5 h 卵龄时期的蚕卵腹侧和背侧开孔/注射的畸形蚕产生数比较

Table 4 Comparison of the occurrence of *Bombyx mori* malformed larvae when the eggs were punctured or injected from the dorsal and ventral side at 5 h after egg laying

处理 Treatment	处理位置 Treatment position	总卵数 Number of treated eggs	孵化卵个数 Number of hatched eggs	畸形蚕头数 Number of malformed larvae	畸形蚕比例 Proportion of malformed larvae
仅开孔 Only puncture	腹侧 Ventral side	208	153	6	3.9
	背侧 Dorsal side	68	57	0	0
开孔 + 注射 Puncture and injection	腹侧 Ventral side	102	49	11	22.5
	背侧 Dorsal side	33	26	0	0

体缓慢。腹足异常蚕站立不稳或移动慢，胸足异常蚕把持桑叶困难，这些导致其取食困难。有的异常蚕蜕皮和变态困难。这些都是造成其发育缓慢的原因。本次记录的这些异常蚕均能化蛹、化蛾和交配产卵，其下一代中没有发现异常，说明这些畸形性状不是一种可遗传的基因水平的变异。开孔后玻璃毛细管的插入必将加重了对蚕卵的损伤，其结果是注射的畸形蚕比例远高于仅开孔的处理(表4)。当卵龄相同时，注射的孵化率必然低于仅开孔的处理(表3)。

家蚕发生学研究发现，蚕卵产下10 h时生殖细胞域位于卵腹侧的后23%~30%的位置(黄君霆等，1995)，所以一般认为腹侧偏后极的注射有利于提高转基因成功率，因为该位置的注射可以将外源核酸送到最接近将来生殖细胞发生的地方。实际上，蚕卵直径仅1 mm左右，手工操作很难控制玻璃管尖停留在腹侧卵壳的内侧的最近处。由于注入压力等的原因，注入的液滴在卵内流动或扩散到卵内更深处甚至到达或越过蚕卵中央。也就是说被注射入蚕卵的核酸的位置跟注入的方向的关系甚微。无论从卵体的任何方向将外源核酸送入卵内，都应该有可能获得转基因的成功。背侧注射能提高整体的孵化率，在获得转因个体上不失为一种有效的备选。本次实验注射的是不含核酸的注射缓冲液，尚不能直接证明背侧注射在转基因成功率上是否有变化，需要进一步的实验验证。

家蚕卵由于具有较硬的卵壳，显微注射时需要通过机械方式对蚕卵进行开孔和核酸注入两个操作，对蚕卵的损伤大、孵化率一直是限制转基因工作的瓶颈。过低的孵化率意味着更大的工作量。本研究通过对注射时期和注射位置进行探讨，发现在一定范围内提早注射时期和选择适当的注射位置，可以提高转基因注射操作后的正常蚕孵化率，为家蚕转基因研究工作提供了有效的参考。

参考文献(References)

Guo XY, Zhou ZY, Feng LC, Wang L, Lu C, Xiang ZH, 2001. Sperm-mediated gene transformation of silkworm. *Prog. Biochem. Biophys.*, 28(3): 423 – 425. [郭秀洋, 周泽扬, 冯丽春, 汪琳, 鲁成, 向仲怀, 2001. 利用精子介导法向蚕卵导入外源基因的研究. 生物化学与生物物理进展, 28(3): 423 – 425]

Huang JT, Zhu WM, Xia JG, Xiang ZH, 1995. Complete Works of Sericultural Technology in China. Sichuan Publishing House of Science & Technology, Chengdu. 488 – 502. [黄君霆, 朱万民, 夏建国, 向仲怀, 1995. 中国蚕丝大全. 成都: 四川科学技术出版社. 488 – 502]

Kanda T, Tamura T, 1991. Microinjection method for DNA in early embryos of the silkworm, *Bombyx mori*, using air-pressure. *Bull. Nat. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, (2): 31 – 46.

Kurihara H, Sezutsu H, Tamura T, Yamada K, 2007. Production of an active feline interferon in the cocoon of transgenic silkworms using the fibroin H-chain expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(4): 976 – 980.

Ma SY, Xu HF, Duan JP, Zhao AC, Zhang MR, Xia QY, 2009. Effect of several factors on the transformation efficiency in the transgenic technology of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 52(6): 595 – 603. [马三垣, 徐汉福, 段建平, 赵爱春, 张美蓉, 夏庆友, 2009. 家蚕转基因技术中若干因素对转基因效率的影响. 昆虫学报, 52(6): 595 – 603]

Meng ZQ, Yao SL, Wang WM, Ye AH, Liu J, 1992. Application of exogenous gene transfer in silkworm (*Bombyx mori*) by microprojection. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 4(1): 93 – 95. [孟智启, 姚山麟, 王为民, 叶爱红, 刘静, 1992. 基因枪喷射技术在家蚕外源基因转移中的应用. 浙江农业学报, 4(1): 93 – 95]

Takami T, 1969. General Principles of Silkworm Variety. National Silkworm Association, Tokyo. 159. [高見丈夫, 1969. 蚕種総論. 東京: 全国蚕種協会. 159]

Tamura T, Kanda T, Quan G, 2001. Effective Method for Introducing Polynucleotide to Silkworm OVA. Japanese patent. Application number: P2001-284927. Publication date: March 25, 2003.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nature Biotechnology*, 18(1): 81 – 84.

Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K, 2003. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nature Biotechnology*, 21(1): 52 – 56.

Wen HX, Lan XQ, Zhang YS, Zhao TF, Wang YJ, Kajiura Z, Nakagaki M, 2010. Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Mol. Biol. Rep.*, 37: 1815 – 1821.

Xu HF, Ma SY, Wang F, Liu YW, Xia QY, 2011. Methods for breaking embryonic diapause for germline transformation of the silkworm practical varieties. *Science of Sericulture*, 37(1): 64 – 68. [徐汉福, 马三垣, 王峰, 刘耀文, 夏庆友, 2011. 适用于实用家蚕品种转基因的蚕卵滞育解除方法. 蚕业科学, 37(1): 64 – 68]

(责任编辑: 赵利辉)